

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



1c968 U.S. PRO  
09/099718  
07/05/01

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 41 861.9

**Anmeldetag:** 26. August 2000

**Anmelder/Inhaber:** Aventis CropScience GmbH, Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Promotoren zur Genexpression in Karyopsen von  
Pflanzen

**IPC:** C 12 N, A 01 H

**Bemerkung:** Die nachgereichten vollständigen Seiten 32 bis 43  
der Beschreibung, die Patentansprüche und das Se-  
quenzprotokoll ist am 30. August 2000 eingegangen.

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 30. April 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident  
Im Auftrag

Wallner

Aventis CropScience GmbH  
Beschreibung

AGR 2000/M 226  
Dr.GRU/pp

2

Die Befestellung von Promotoren ist im Zusammenhang mit der Expression von Strukturgenen von großer Bedeutung für die Herstellung von transgenen Pflanzen, da die Spezifität eines Promotors ausschlaggebend dafür ist, zu welchem Zeitpunkt, in welchen Gewebeotypen unter welchen physiologischen Bedingungen und mit welcher Intensität ein transferiertes Gen in der modifizierten Pflanze exprimiert wird.

5 Promotoren zur Genexpression in Karyopsen von Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotoren, die eine karyopsenspezifische Expression oder Suppression von Genen in genetisch modifzierten Pflanzen erlauben, Verfahren zur gewebe spezifischen Genexpression oder Gensuppression in Pflanzen, Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Wirtszellen, die solche Promotoren enthalten, mit besagten Promotoren transformierte transgene Pflanzenzellen und Pflanzen, sowie Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen.

10 Nachfolgend werden Dokumente aus dem Stand der Technik zitiert, deren Offenbarungsgehalt hiermit durch Referenz Teil dieser Anmeldung ist.

Der Einsatz von Pflanzen, die mit Hilfe gentechnischer Verfahren in ihrem Erbgut verändert wurden, hat sich in vielen Bereichen der Landwirtschaft als vorteilhaft erwiesen, um bestimmte Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen. Die vornehmlichen Ziele sind vor allem Pflanzenschutz und zum anderen eine Qualitäts- und Ertragssteigerung der erntbaren Produkte.

15 Auch die Verwendung zell- und gewebe spezifischer Promotoren wurde beschrieben: schließzellspezifische (DE-A-4207358), samen-, knollen- und fruchtspezifische (zusammengefäßt in Edwards and Coruzzi, Annu. Rev. Genet. 24 (1990), 275-303; DE-A-3843627), phloemspezifische (Schmülling et al., Plant Cell 1 (1989), 665-670), wurzelknöllchenspezifische (DE-A-3702497) oder meristemspezifische Genexpression (Ito et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 863-878).

20 Pflanzen sind bekannt (vgl. u.a. Gasser und Fraley, Science 244 (1989), 1293-1299; Polrykus, Ann. Rev. Plant Mol. Biol. Plant Physiol. 42 (1991), 205-225). Oft basieren diese auf der Übertragung von Genkonstrukten, die in den meisten Fällen Kombinationen von bestimmten codierenden Regionen von Strukturgenen mit Promotorregionen derselben oder anderer Struktur gene, sowie Transkriptionsterminatoren darstellen.

25 30

Die Verwendung der beschriebenen Promotoren ist oft mit Nachteilen verbunden. Promotoren, die eine konstitutive Expression der von ihnen kontrollierten Gene bewirken, können beispielsweise zur Erzeugung herbizidtoleranter und pathogenresistenter Pflanzen eingesetzt werden, haben aber den Nachteil, daß die Produkte der von ihnen kontrollierten Gene in allen Teilen der Pflanze vorliegen, was unerwünscht sein kann, z.B. wenn die Pflanzen der Ernährung dienen sollen. Ein negativer Aspekt der gewebe- und/oder entwicklungsunabhängigen Expression eines Transgens kann außerdem in einer unerwünschten Wirkung auf die Pflanzentwicklung bestehen. Induzierbare Promotoren sind gleichfalls mit Nachteilen verbunden, da die Induktionsbedingungen bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzen im Freiland typischerweise schwer kontrollierbar sind.

Darüberhinaus ist es zur Bewältigung verschiedener Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen erforderlich, Gene, die unterschiedlich reguliert werden sollen, unter die Kontrolle verschiedener Promotoren zu stellen. Es ist daher notwendig, verschiedene Promotorsysteme mit unterschiedlicher Spezifität zur Verfügung zu stellen.

Die kontrollierte Expression von Transgenen ist zum Beispiel für das Einbringen von Pflanzen von großem Nutzen. Soll ein Transgen in definierte Stoffwechselvorgängen in einer Pflanze eingreifen, z.B. einen neuen Inhaltstoff produzieren oder vor Pathogenbefall schützen, ist seine räumlich und/oder zeitlich kontrollierte Expression nur unter Verwendung eines induzierbaren und/oder gewebe- und/oder entwicklungsspezifischen Promotors möglich. Erst dadurch wird die gezielte Produktion von erwünschten Inhaltsstoffen in einem definierten Entwicklungsstadium oder Gewebe der Pflanze ermöglicht. Z. B. kann für die Anwendung der Antisense-Technologie, in der die Expression von pflanzeneigenen Genen verhindert werden soll, der Einsatz von gewebe- und/oder entwicklungsspezifischen Promotoren gegenüber einer gewebe- und/oder entwicklungsunabhängigen Expression von

Vorteil sein: Der Antisense-Effekt tritt so genau in dem Entwicklungsstadium bzw. Gewebe der Pflanze auf, in dem auch das pflanzeneigene Gen exprimiert wird.

4

5 Promotoren, die die Genexpression in der Karyopse regulieren sind bisher nur in begrenzter Zahl bekannt. Zur Bewältigung bestimmter Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen ist es erforderlich, alternative Promotorsysteme zur Genexpression in der Karyopse zur Verfügung zu stellen, die im Vergleich zu den bekannten Systemen unterschiedlich reguliert sind.

10 Aus verschiedenen Pflanzenspezies wurden Gene der Stärkebiosynthese isoliert, deren Genprodukte spezifisch im Speichergewebe der Karyopse, nicht aber in vegetativen Geweben exprimiert werden, z.B. entsprechende Gene bzw. cDNA-Klone der GBSS I. Dazu gehört der waxy Locus aus Mais (Klösgen *et al.* (1986) Mol. Gen. Genet. 203: 237-244), sowie aus Gerste (Rohde *et al.* (1988) Nucleic Acid Research 16, No. 14: 7185-7186), Reis (Wang *et al.* (1990) Nucleic Acid Research 18: 5898), Kartoffel (van der Leij *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 228: 240-248), Erbsen (Dry *et al.* (1992) Plant J. 2: 193-202), Mais (Salehuzzaman *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 20: 947-962), Hirse (Hsingh *et al.* (1995) Acc.Nr. U23954), und Zuckerrübe (Schnieder *et al.* (1999) Mol. Gen. Genet. 262: 515-524).

20 Auch aus Weizen wurde bereits eine waxy-cDNA isoliert und sequenziert (Clark *et al.* (1991) Plant Mol. Biol. 16: 1099-1101; Ainsworth *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 22: 67-82). Ein weiterer Klon der GBSS I wurde aus einer cDNA-Bank von ca. 20 Tage alten Weizenkaryopsen isoliert (Block (1997) "Isolierung, Charakterisierung und 25 Expressionsanalysen von Stärkesynthase-Genen aus Weizen" (*Triticum aestivum* L.), Dissertation, Universität Hamburg). Von dieser GBSS I konnte nachgewiesen werden, daß sie in Karyopse und Pollen exprimiert wird.

Während inzwischen drei homologe waxy Strukturgene, die auf den Chromosomen 30 7A, 4A und 7D des hexaploiden Weizes liegen, isoliert wurden (Murai *et al.* (1999) Gene 234: 71-79), sind die Promotorsequenzen dieser oder anderer genomischer

Klonen aus Weizen bisher unbekannt. Bekannt sind lediglich die 5'-flankierenden Bereiche der GBSS I aus Gerste (GenBank Acc.No. X07931), Löwenmäulchen (GenBank Acc.No. AJ006294), Reis (GenBank Acc.No. AB008794, AB008795), Kartoffel (GenBank Acc.No. X58453) und Mais (GenBank Acc.No. X03935).

5 Ein cDNA-Klon einer stärkekorngebundenen Stärkesynthase vom Typ II (GBSS II), die nicht im Endosperm, sondern nur in Blättern und im Perikarp von Weizen exprimiert wird, konnte kürzlich isoliert werden (Vrinten & Nakamura (2000) Plant Physiol. 122: 255-263). In diploidem Weizen (*Triticum monococcum* L.) wurde außerdem auf Proteinebene eine 56kDa große Isoform einer GBSS beschrieben (Fujita & Taira (1998) Planta 207: 125-132). Diese Isoform kann im Perikarp, Aleuron und Embryo von unreifen Karyopsen nachgewiesen werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, die eine gezielte Karyopsenspezifische Genexpression in genetisch modifizierten Pflanzen ermöglichen, vorzugsweise in monokotylen Pflanzen.

Durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Mittel, d.h. der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, Vektoren, Zellen oder Pflanzen, wird ein gewebe- und/oder entwicklungsspezifisch definierter Eingriff in den pflanzlichen Stoffwechsel ermöglicht, z.B. in die Biosynthese von Speicherstärke oder die Nutzung der Karyopse als Speicher- oder Syntheseorgan für Stärke oder andere Reservestoffe (z.B. Polysaccharide, Fettsäuren, ggf. modifizierte Speicherproteine oder biopolymere Kunststoffe) ermöglicht.

Unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen können somit Gene, insbesondere während der Kornentwicklung von Getreiden, spezifisch und zu einem frühen Zeitpunkt in der Karyopse exprimiert werden.

30 Mittels der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen können darüber hinaus Gene, insbesondere während der Kornentwicklung von Getreiden, spezifisch und zu einem

frühen Zeitpunkt in der Karyopse durch sog. gene silencing'-Strategien (Cosuppression) supprimiert werden. Cosuppressionsstrategien unter Einsatz von Promotoren sind ausführlich von Vaucheret et al. (Vaucheret et al., 1998, 16(6), 651-659) beschrieben worden. Insbesondere der Abschnitt 'Transcriptional trans-inactivation' auf Seite 652 des Artikels von Vaucheret et al. sei hiermit durch Referenz Teil dieser Anmeldung, der speziell Cosuppressionsstrategien beschreibt, für die die erfindungsgemäßen Promotoren geeignet sind, insbesondere solche, die dort als 'ectopic trans-inactivation' bezeichnet werden können (Matzke et al., 1994, Mol Gen Genet. 244: 219-229). Solchermaßen können die erfindungsgemäßen Promotoren dazu verwendet werden, die Genexpression beliebiger Gene zu supprimieren, die unter der Kontrolle eines Promotors stehen, der als Ziel für die Cosuppression durch die erfindungsgemäßen Promotoren zugänglich ist. Gegebenenfalls ist hierfür bereits ein Sequenzabschnitt von nur etwa 90 bp Länge ausreichend.

Die erfindungsgemäßen Promotoren ermöglichen so beispielsweise die gezielte Veränderung von Speicherstärke. Um eine möglichst vielfältige Anwendung von Stärke für die unterschiedlichsten industriellen Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert Pflanzen bereitzustellen, die Stärken mit definierten Eigenschaften synthetisieren können. So werden z.B. für die verarbeitende Industrie entscheidende Eigenschaften wie Löslichkeit, Verkleisterungsverhalten, Retrogradierungstendenz, Viskosität und Komplexbildung ermöglicht durch das Verhältnis von Amylose und Amylopektin zueinander, dem Verzweigungsgrad des Amylopektins und die Derivatisierung der Polymere bestimmt. Eine gezielte Modifizierung solcher Eigenschaften ersetzt aufwendige Verfahren zur Trennung von Amylose und Amylopektin oder die kostspielige chemische Modifizierung von Stärke.

30 Eine begrenzte Möglichkeit, solche Pflanzen zu erhalten, besteht in der Anwendung klassischer Züchtungsmethoden. Durch Kreuzung spontan auftretender Mutanten gelang so zum Beispiel die Herstellung eines (amylosefreien) "waxy" Weizens (Nakamura et al. (1995) Mol. Gen. Genet. 248: 253-259). Aufgrund des polyploiden

Charakters des kommerziell bedeutenden Brot-Weizens sind Mutationen welche die Stärkestruktur betreffen nicht leicht zu erkennen, da sie von intakten Allelen kompensiert werden. Die Anwendung klassischer Züchtungsmethoden erweist sich daher als schwierig. Außerdem kann nur auf bereits vorhandene Enzymaktivitäten zurückgegriffen werden. Neue Aktivitäten, die bisher nicht in Pflanzen identifiziert wurden oder die in Pflanzen (oder anderen Organismen) identifiziert wurden, die nicht mit der Zielpflanze kreuzbar sind, können ebenfalls nicht mit Hilfe züchterischer Verfahren bearbeitet werden.

10 Eine Alternative besteht in der gezielten Modifikation stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch neben der Identifizierung und Isolierung von Genen, deren Produkte an der Stärkesynthese und/oder Stärkemodifikation beteiligt sind, der Einsatz spezifischer Promotoren, die eine gewebe- und/oder entwicklungsspezifische Expression der von ihnen kontrollierten Gene in den stärkebildenden Geweben vermitteln.

15 Durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen können außerdem auch solche Gene eingebracht werden, die dem Getreideendosperm eine modifizierte Funktion als Speichergerüste für andere Speicherstoffe verleihen.

20 Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

25 Es wurde nun gefunden, daß überraschenderweise ein Promotor wie nachfolgend definiert in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihm kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirkt.

Charakters des kommerziell bedeutenden Brot-Weizens sind Mutationen welche die Stärkestruktur betreffen nicht leicht zu erkennen, da sie von intakten Allelen kompensiert werden. Die Anwendung klassischer Züchtungsmethoden erweist sich daher als schwierig. Außerdem kann nur auf bereits vorhandene Enzymaktivitäten zurückgegriffen werden. Neue Aktivitäten, die bisher nicht in Pflanzen identifiziert wurden oder die in Pflanzen (oder anderen Organismen) identifiziert wurden, die nicht mit der Zielpflanze kreuzbar sind, können ebenfalls nicht mit Hilfe züchterischer Verfahren bearbeitet werden.

5 b) ein „der mehrere Sequenzelemente umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

1) cacgcaagg cggctggcc agccacgac (Seq ID No. 2);  
 ii) agaaacaaac aaacaaacaa aaaagt (Seq ID No. 3);  
 5 iii) cttttcagg a ctagctcg gtgccttaag acacctacc ttgtgtcta tgacatgtga  
 gcccaacag atggc (Seq ID No. 4);  
 iv) cccgtttagg ctttcgggtt ccggcc (Seq ID No. 5);  
 v) caggaggct tcga (Seq ID No. 6);  
 vi) tcaggcaggat ccaccccggtt caccg (Seq ID No. 7) und  
 tactctgtc atgttaa (Seq ID No. 8);  
 10 10 c) einen funktionalen Teil der in a) genannten Nucleinsäuresequenz umfaßt;  
 d) eine Sequenz umfaßt, die mit mindestens einer der in a) und/oder b) genannten Nucleinsäuresequenzen hybridisiert; und/oder  
 e) eine Sequenz umfaßt, die mit einer der in a) genannten Nucleinsäuresequenzen zu mindestens 60 %, vorzugsweise zu mindestens 75 %, insbesondere zu mindestens 90 % und ganz besonders bevorzugt zu mindestens 95% identisch ist.

15 Weiterhin ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül mit der Funktion eines karyopsenspezifischen Promotors, das

20 a) ein oder mehrere Sequenzelemente umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

1) cacgcaagg cggctggcc agccacgac (Seq ID No. 2);  
 ii) agaaacaaac aaacaaacaa aaaagt (Seq ID No. 3);  
 25 iii) cttttcagg a ctagctcg gtgccttaag acacctacc ttgtgtcta tgacatgtga  
 gcccaacag atggc (Seq ID No. 4);  
 iv) cccgtttagg ctttcgggtt ccggcc (Seq ID No. 5);  
 v) caggaggct tcga (Seq ID No. 6);  
 vi) tcaggcaggat ccaccccggtt caccg (Seq ID No. 7) und  
 30 vii) tactctgtc atgttaa (Seq ID No. 8)

sowie

b) einen funktionalen Teil der Seq ID No. 1 umfaßt, vorzugsweise ein oder mehrere Sequenzelemente aus der Gruppe bestehend aus den Nukleotiden der Position 1-26; 31-62; 68-103; 109-140; 146-240; 247-235; 260-263; 283-294; 315-329; 337-408; 414-450; 457-500; 506-519; 524-559; 568-609; 620-638; 645-655; 661-701; 728-752; 758-770; 776-792; 802-821; 827-869; 875-889; 896-928; 957-965; 974-986; 1032-1037; 1074-1106; 1114-1139; 1145-1258; 1274-1288; 1294-1323; 1330-1343; 1355-1362; 1369-1398; 1409-1448; 1454-1485; 1496-1557; 1577-1602; 1610-1643; 1663-1689; 1696-1747; 1755-1835; 1843-1870; 1876-1886; 1902-1929; 1938-1987; 1994-2013; 2020-2034; 2041-2076; 2084-2137; 2138-2298; 2148-2241; 2251-2282; 2398-2317; 2317-3139; 2335-2378; 2425-2487; 2495-2522; 2528-2553; 2560-2656; 2663-2706; 2712-2811; 2824-2841; 2853-2867; 2885-2922; 2928-2943; 2951-2983; 2990-3021; 3036-3139 und 3051-3139 von Seq. ID No. 1.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die Begriffe „erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül“ und „erfindungsgemäßiger Promotor“ im allgemeinen als Synonyme verwendet.

5 werden, um die Expression des korrespondierenden Nukleinsäuremoleküls zu verstärken, ohne jedoch seine gewebebespezifische Expression zu beeinflussen. Auch individuelle *cis*-Elemente (s.u.) der isolierten Promotoren können ebenfalls zu regulatorischen Einheiten miteinander kombiniert werden.

10 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem "Promotor" eine DNA-Sequenz verstanden, die den regulatorischen Anteil eines Gens, vorzugsweise eines Strukturgens, umfaßt. Unter dem "regulatorischen Anteil" eines Gens wird derjenige Anteil verstanden, der die Expressionsbedingungen des Gens bestimmt.

15 Ein regulatorischer Anteil besitzt ein Sequenzmotiv, mit dem Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten und die Transkription des codierenden Anteils des Gens einleiten. Darüber hinaus kann der regulatorische Anteil ein oder mehrere positive regulatorische Elemente, sogenannte Enhancer umfassen. Er kann zusätzlich oder an deren Stelle aber auch negativ regulatorische Elemente, sogenannte Silencer enthalten. Unter einem "Strukturgen" wird im allgemeinen eine genetische Einheit aus regulatorischem und codierendem Anteil verstanden, deren Genprodukt im allgemeinen ein Protein ist. Die Information für die primäre Aminosäuresequenz des Genprodukts ist im codierenden Anteil des Strukturgens enthalten, während der regulatorische Anteil bestimmt, wann, in welchen Geweben, unter welchen physiologischen Bedingungen und in welchen Mengen das Transkript des codierenden Anteils gebildet wird, nach dessen Vorlage das Genprodukt synthetisiert wird.

20 Unter dem Begriff "Karyopsenspezifisch" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß ein unter der Kontrolle eines erfindungsgemäßigen Promotors stehendes Gen in der Karyopse, d.h. Endosperm, Perikarp und Pollen und/oder Scutellum exprimiert wird, vorzugsweise zu einem frühen Zeitpunkt nach der Befruchtung, d.h. etwa 15-5dap (dap = Tage nach der Bestäubung), vorzugsweise etwa 10-5 dap, insbesondere etwa 5 dap. Insbesondere ist Karyopsenspezifität im Rahmen der vorliegenden Erfindung dann gegeben, wenn der erfindungsgemäßige Promoter die Expression eines Gens in der Karyopse im Vergleich zu anderen

25 25

30

Geweben wie z.B. mATUREN Blättern oder Wurzeln begünstigt und in der Karyopse eine signifikante Erhöhung, d.h. eine 2- bis 5-fach, vorzugsweise 5- bis 10-fach, insbesondere 10- bis 100-fach höhere Expressionsrate bewirkt.

5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann Karyopsenspezifität z.B. durch übliche Reportergen-Experimente analysiert werden. Zur Testung einer isolierten Promotorsequenz auf deren Promotoraktivität in Karyopse kann der Promotor beispielsweise in einer Expressionskassette bzw. in einem Vektor zur Pflanzentransformation operativ mit einem Reportergen, wie z.B. dem  $\beta$ -Glucuronidasegen (gus) aus *E. coli*, verknüpft werden. Dieses Konstrukt wird dann zur Transformation von Pflanzen verwendet. Anschließend wird die Expression der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) in der Karyopse im Vergleich zu anderen Geweben, wie z.B. mATUREN Blättern oder Wurzeln bestimmt, wie z.B. bei Martin et al. (The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression, In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Academic Press (1992), 23-43) beschrieben.

10 Der Begriff "Karyopse" ist dem Fachmann geläufig und umfaßt insbesondere Perikarp und Endosperm. Da diese Gewebe eine dynamische Entwicklung durchlaufen, korreliert z.B. die Entwicklung des Endosperms in verschiedene Zell- oder Gewebetypen mit unterschiedlichen biochemischen Aktivitäten, bedingt durch eine differenzielle Genexpression. Ergänzend sei auf Olsen et al. verwiesen (Olsen et al., 1999, Trends in Plant Science 4 (7), 253-257).

15 Der erfindungsgemäßige Promotor erdaubt eine karyopsenspezifische Genexpression einer von ihm kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz. Er stellt eine interessante Alternative zu bekannten Promotoren dar, weil er auch die Genexpression im Perikarp vermitteln kann und darüber hinaus bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Karyopse aktiv ist, d.h. etwa 15-5 dap, vorzugsweise etwa 10-5 dap, insbesondere etwa bei 5 dap. Mit Hilfe des erfindungsgemäßigen Promotors kann insbesondere die Expression von solchen Genen effektiv gesteuert

werden, deren Genprodukte am Stärkemetabolismus in monokotylen Pflanzen und insbesondere Weizen beteiligt sind.

55 Vierfältige Verwendungsmöglichkeiten stehen für die erfindungsgemäßigen Promotoren zur Verfügung. Beispielsweise wird die Herstellung transgener Pflanzen ermöglicht, die aufgrund eines modifizierten Metabolismus in der Karyopse eine qualitativ und/oder quantitativ veränderte Speicherstoffzusammensetzung in ihrem Speichergewebe, d.h. im Getreidekorn aufweisen.

10 Neben einem Promotor, der die gesamte durch SEQ ID No. 1 definierte Sequenz, bzw. die entsprechend durch DSM 13398 hinterlegte Sequenz aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen Teil dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

15 Unter einem "funktionalen Teil" des erfindungsgemäßigen Promotors versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung solche Sequenzen, welche nicht die vollständige Sequenzen der besagten Promotoren, wie durch SEQ ID No. 1 definiert, bzw. durch DSM 13398 hinterlegt, umfassen, sondern verkürzt sind. Trotz der Verkürzung besitzen „funktionale Teile“ die erfindungsgemäßige Karyopsenspezifität. Sequenzen die einen funktionalen Teil der Seq. ID No. 1 enthalten, weisen vorzugsweise einen oder mehrere der nachfolgend aufgezählten Abschnitte aus der SEQ ID No. 1 auf: 1-26; 31-62; 68-103; 109-140; 146-240; 247-235; 260- 263; 283-294; 315-329; 337-408; 414-450; 457-500; 506-519; 524-558; 20 25 568-609; 620-638; 645-655; 661-701; 728-752; 758-770; 776-792; 802-821; 827-869; 875-889; 896-928; 957-965; 974-986; 1032-1037; 1074-1106; 1114-1139; 1145-1258; 1274-1288; 1294-1323; 1330-1343; 1355-1362; 1369-1398; 1409-1448; 1454-1485; 1496-1557; 1577-1602; 1610-1643; 1663-1689; 1696-1747; 1755-1835; 1843-1870; 1876-1886; 1902-1929; 1938-1987; 1994-2013; 2020-2034; 2041-2076; 30 2084-2137; 2138-2298; 2148-2241; 2251-2282; 2398-2317; 2317-3139; 2355-2378; 2425-2487; 2495-2522; 2528-2553; 2560-2656; 2663-2706; 2712-2811; 2824-2841;

2853-2867; 2885-2922; 2928-2943; 2951-2983; 2990-3021; 3036-3139 und/oder 3051-3139; die Nukleotidpositionen sind auf Seq. ID No. 1 bezogen.  
Vorzugsweise weisen „funktionale Teile“ des erfundungsgemäßen Promoters eine Länge von etwa 50-3100 bp auf, insbesondere etwa 100-3100 bp und ganz 5 besonders etwa 430-3100 bp.

Ein Maß für die Promotoraktivität ist beispielsweise die für ein bestimmtes MarkerGen ermittelte Expressionsrate, wenn es unter der regulativen Kontrolle des erfundungsgemäßen Promoters steht. Beispiele für geeignete Markergene sind das 10  $\beta$ -Glucuronidase-Gen (aus *E. coli*) (Jefferson (1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol.5 (4): 387-405) oder das Green-Fluorescence-Protein-Gen (gfp) (Baulcombe et al., Plant J. 7 (16) (1993), 1045-1053). Die Organ- bzw. Gewebespezifität lässt sich leicht durch Vergleich der an einzelnen Geweben bzw. Organen der Pflanze ermittelten Expressionsraten für besagte Markergene 15 bestimmten. Funktionale Teile der Promotorsequenzen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung sowohl natürlich vorkommende Varianten der erfundungsgemäßen Sequenzen, als auch künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene Nukleotidsequenzen.

Unter einem „funktionalen Teil“ werden insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Promotorsequenz verstanden, welche die oben genannten erfundungsgemäßen Merkmale und physiologischen Funktionen besitzen. Der Begriff „Mutationen“ umfasst hierbei Substitutionen, 20 Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotide, insbesondere von gesigneten cis-Elementen, speziell wie nachfolgend definiert (s.u.). Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung umfasst, welche durch Modifikation der durch Seq ID No. 1 definierten bzw. der durch DSM 13398 hinterlegten Promotorsequenz erhalten werden kann. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Herstellung von 25 Fragmenten oder die Einfügung oder Umstellung von bekannten Nukleotid-Motiven wie z.B. von Restriktionsschnittstellen oder cis-Elementen sein.

Funktionale Teile der erfundungsgemäßen Promotorsequenz umfassen dabei auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem unmodifizierten Promotor (Wildtyp), abgeschwächt oder verstärkt ist.

5 Insbesondere werden unter funktionalen Teilen der erfundungsgemäßen Promotorsequenzen die durch Deletionsanalyse (vgl. Beispieldetail) identifizierbaren Bereiche verstanden, vorzugsweise die Sequenzabschnitte 948-3139; 1006-3139; 1240-3139; 1259-3139; 1382-3139; 1486-3139; 1514-3139; 1655-3139; 1822-3139; 1887-3139; 2138-3139 und 2176-3139 der Seq ID No. 1.

Prinzipiell wird die Aktivität eines eukaryontischen RNA-Polymerase II-Promotors durch das synergistische Zusammenwirken verschiedener trans-aktiver Faktoren (DNA-bindende Moleküle wie Proteine oder Hormone) bedingt, welche an die verschiedenen im Promotor vorhandenen cis-regulatorischen DNA-Elemente, in der 10 Regel etwa 10-20 Nukleotide lange DNA-Bereiche binden. Diese Faktoren wechselwirken direkt oder indirekt mit einem oder mehreren Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, was letztlich zur Ausbildung eines Präinitiationskomplexes in der Nähe der Transkriptionsstartstelle führt (Drapkin et al., Current Opinion in Cell Biology 5 (1993), 469-476). Man kann von einem 15 modularen Aufbau eukaryontischer RNA-Polymerase II-Promotoren aus gehen, wobei die cis-Elemente (Module) als Teilkomponenten des Promotors dessen Aktivität im einzelnen determinieren (Tjian und Maniatis, Cell 77 (1994), 5-8).

Einzelne, potentiell Gewebespezifität vermittelnde Subdomänen des 20 erfundungsgemäßen Promotors können beispielsweise durch Fusion mit einer Minimalpromotor-Reportergen-Kassette identifiziert werden. Unter einem Minimalpromotor versteht man eine DNA-Sequenz, die eine TATA-Box, die sich etwa 20 bis 30 Basenpaare stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle befindet, oder eine Initiatorsequenz (Smale und Baltimore, Cell 57 (1989), 103-113; Zawel und Reinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. 44 (1993), 67-108; Conaway und Conaway, 25 Annu. Rev. Biochem 62 (1993), 161-190) umfasst. Beispiele für Minimalpromotoren 30

sind der -63 bis +8  $\Delta$ 35S-Promotor (Frohberg, Dissertation an der FU Berlin FB Biologie (1994)), der -332 bis +14 Minimal-Patatin-Classifier-Promotor sowie der -176 bis +4-Minimal-PetE-Promotor (Pwee et al., Plant J. 3 (1993), 437-449.)

5 Des Weiteren können Subdomänen bzw. cis-Elemente des erfindungsgemäßen Promoters auch über Deletionsanalysen bzw. Mutagenesen identifiziert werden (Kawagoe et al., Plant J. 5(6) (1994), 885-890). Der Test auf Funktionalität einer solchen Subdomäne oder cis-Elements des Promoters kann *in planta* durch den Nachweis von Reportergenaktivität in stabil transformierten Zellen erfolgen.

10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung daher insbesondere durch Di- oder Multimerisierung von Subdomänen bzw. cis-Elementen von SEQ ID No. 1 erhaltenen Modifikationen von Seq. ID No. 1.

15 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp durch die Kombination des erfindungsgemäßen Promoters mit einem sogenannten Enhancer erreicht. In der Literatur sind verschiedene Enhancer beschrieben worden, die in der Regel eine gewebespezifische Erhöhung der Expression bewirken, wobei die Gewebespezifität im allgemeinen durch den jeweils verwendeten Enhancer determiniert wird (Benfey et al., Science 250 (1990), 959-966; Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202; Chen et al., EMBO J. 7, (1988), 297-302; Simpson et al., Nature 323 (1986), 551-554).

20 Darüberhinaus gibt es auch Enhancer, wie z.B. den PetE Enhancer (Sandhu et al., Plant Mol. Biol. 37 (1998), 885-896), die nicht gewebespezifisch wirken und somit als quantitative Verstärkerelemente vor den erfindungsgemäßen Promotor gesetzt werden können, um die Expression in der Karyopse zu erhöhen, ohne die Qualität der Gewebespezifität des erfindungsgemäßen Promotors zu verändern.

25

Darüberhinaus gibt es auch Enhancer, wie z.B. den PetE Enhancer (Sandhu et al., Plant Mol. Biol. 37 (1998), 885-896), die nicht gewebespezifisch wirken und somit als quantitative Verstärkerelemente vor den erfindungsgemäßen Promotor gesetzt werden können, um die Expression in der Karyopse zu erhöhen, ohne die Qualität der Gewebespezifität des erfindungsgemäßen Promotors zu verändern.

Ferner können auch synthetische Enhancer verwendet werden, die beispielsweise von natürlich vorkommenden Enhancern abgeleitet sind und/oder durch Kombination verschiedener Enhancer erhalten werden.

5 Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die eine Nucleotidsequenz aufweisen, die mit der durch SEQ ID No. 1 definierten bzw. durch DSM 13398 hinterlegten Nucleotidsequenz hybridisieren, vorzugsweise unter stringenteren Bedingungen und die in Pflanzen einen karyopsenspezifischen Einfluß auf die Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz ausüben.

10 Der Ausdruck "stringente Bedingungen" bedeutet dabei beispielsweise Hybridisierungsbedingungen, wie sie in Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschreiben sind. Insbesondere findet eine stringente Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen statt: Hybridisierungspuffer: 2x SSC; 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1); 0.1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml Heringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 0.25 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 20 1 mM EDTA, 7% SDS Hybridisierungstemperatur T = 65 bis 68 °C; Waschpuffer 0.2 x SSC; 0.1% SDS; Waschtemperatur T = 65 bis 68 °C.

15 Vorzugsweise weisen derartige Promotoren eine Sequenzidentität von mindestens 30%, bevorzugt von mindestens 40%, bevorzugt von mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 60%, insbesondere bevorzugt von mindestens 70% und vorzugsweise von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90% und insbesondere bevorzugt mindestens 95% zu der unter Seq ID No. 1 gezeigten 20 Promotorsequenz oder Teilen davon auf. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ ID No. 1

dargestellten Nucleotidsequenz bestimmt. Wenn zwei zu vergleichende Sequenzen eine unterschiedliche Länge aufweisen, bezieht sich die Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nucleotidreste der kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den Nucleotidresten der längeren Sequenz. Die

5 Sequenzidentität kann z. B. durch Verwendung von Computerprogrammen wie das BestFit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711) bestimmt werden. BestFit nutzt den lokalen Homologiealgorithmus von Smith und Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, um das

10 Segment mit höchster Sequenzidentität zwischen zwei Sequenzen zu finden. Bei der Anwendung von BestFit oder einem anderen Sequenz-Alignment-Programm zur Bestimmung, ob eine bestimmte Sequenz beispielsweise zu 95% identisch ist mit einer Referenzsequenz der vorliegenden Erfindung, werden die Parameter vorzugsweise so eingestellt, daß der Prozentsatz der Identität über die gesamte

15 Länge der Referenzsequenz berechnet wird und daß Homologielücken ("gaps") von bis zu 5% der Gesamtzahl der Nucleotide in der Referenzsequenz erlaubt sind. Bei der Verwendung von BestFit können die sogenannten optionalen Parameter bei ihren voreingestellten ("default") Werten belassen werden. Die Abweichungen, die bei dem Vergleich einer gegebenen Sequenz mit den oben beschriebenen

20 Sequenzen der Erfindung auftreten, können beispielsweise durch Addition, Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination verursacht sein. Promotorsequenzen, die wie oben beschrieben mit der durch SEQ ID No. 1 definierten bzw. durch DSM 13398 hinterlegten Nucleotidsequenz hybridisieren, stammen vorzugsweise aus pflanzlichen Organismen, bevorzugt aus höheren Pflanzen, besonders bevorzugt aus monokotylen Pflanzen, insbesondere bevorzugt aus Graminen und ganz besonders Pflanzen der Gattung *Triticum*.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen Teil der erfundungsgemäßigen Promotoren aufweisen und die in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden

Nucleotidsequenz bewirken und die ein oder mehrere Sequenzen der Seq ID No. 2-Seq ID No. 8 umfassen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der erfundungsgemäßige Promotor die gesamte Seq ID No. 1 oder einen funktionalen Teil der durch SEQ ID No. 1 definierten bzw. durch DSM 13398 hinterlegten Nucleotidsequenz auf, insbesondere die Nukleotide 948-3139; 1006-3139; 1240-3139; 1259-3139; 1382-3139; 1486-3139; 1514-3139; 1655-3139; 1822-3139; 1887-3139; 2138-3139 und 2176-3139 aus der Seq ID No. 1.

10 Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Expressionskassetten enthaltend einen oder mehrere der erfundungsgemäßigen Promotoren. Unter dem Begriff "Expressionskassette" wird dabei die Kombination eines erfundungsgemäßigen Promotors mit einer zu exprimierenden Nucleinsäuresequenz verstanden. Diese

15 Nucleinsäuresequenz kann beispielsweise eine ein Polypeptid codierende Sequenz sein, z.B. ein Gen, das in sense- oder in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft sein kann. Die Nucleinsäuresequenz kann auch eine nicht-translatierbare RNA, beispielsweise eine antisense-RNA oder ein Ribozym, codieren. Diese Nucleinsäuresequenzen können in Verbindung mit dem erfundungsgemäßigen Promotor benutzt werden, um Pflanzen mit verändertem Phänotyp herzustellen.

20 Die erfundungsgemäßigen Expressionskassetten können weiterhin eine Transkriptionsterminationssequenz stromabwärts des 3'-Endes der mit dem Promotor verknüpften Nucleinsäuresequenz enthalten. Unter einer "Transkriptions-terminationssequenz" wird dabei eine DNA-Sequenz verstanden, die am 3'-Ende eines codierenden Genabschnitts lokalisiert ist und in der Lage ist, die Beendigung der Transkription und gegebenenfalls die Synthese eines Poly-A-Schwanzes hervorzurufen. Ein Beispiel für eine solche Terminationssequenz ist die des Octopinsynthasegens. Weitere sind dem Fachmann gut bekannt.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die mindestens einen erfindungsgemäßem Promotor enthalten.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäß Promotor in einem derartigen Vektor verknüpft mit Restriktionschnittstellen bzw. einem Polylinker, die eine Integration beliebiger Sequenzen stromabwärts des Promoters erlauben. Dabei wird unter einem "Polylinker" eine DNA-Sequenz verstanden, die Erkennungsssequenzen von mindestens einem Restriktionsenzym, vorzugsweise von zwei oder mehr Restriktionsenzymen, enthält.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäß Promotor in einem derartigen Vektor verknüpft mit Restriktionschnittstellen bzw. einem Polylinker, die eine Integration beliebiger Sequenzen stromabwärts des Promoters erlauben. Dabei wird unter einem "Polylinker" eine DNA-Sequenz verstanden, die Erkennungsssequenzen von mindestens einem Restriktionsenzym, vorzugsweise von zwei oder mehr Restriktionsenzymen, enthält.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßer Vektor auch noch eine Sequenz für die Termination der Transkription, beispielsweise die des Octopinsynthasegens, stromabwärts des Promoters bzw. des Polylinkers.

15 Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die erfindungsgemäß Expressionskassetten enthalten. Gegebenenfalls enthalten die erfindungsgemäß Vektoren Selektionsmarker, die geeignet sind, Zellen, die die erfindungsgemäß Vektoren enthalten, zu identifizieren und gegebenenfalls zu selektionieren.

10

15

20

25

30

"Genetisch modifiziert" bedeutet dabei, daß die Wirtszelle einen erfindungsgemäßem Promotor, eine erfindungsgemäß Expressionskassette oder einen erfindungsgemäßem Vektor enthält, vorzugsweise stabil in das Genom der Wirtszelle integriert, und der Promotor bzw. die Expressionskassette entweder in die Wirtszelle oder in einen Vorgänger dieser Zelle als Fremd-DNA eingebracht wurde. D.h. die erfindungsgemäß Wirtszellen können entweder selbst das unmittelbare Produkt eines Transformationsergebnisses sein oder davon abstammende Zellen sein, die einen erfindungsgemäßem Promotor oder eine erfindungsgemäß

5 Expressionskassette enthalten. Als Wirtszellen kommen sowohl prokaryontische, insbesondere bakterielle, als auch eukaryontische Zellen in Frage. Eukaryontische Zellen können beispielsweise Pilzzellen sein, insbesondere der Gattung *Saccharomyces*.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäß Vektoren, erfindungsgemäß Expressionskassetten oder erfindungsgemäß Wirtszellen, insbesondere Wirtszellen der Gattung *Agrobacterium* zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.

15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäß Vektoren, erfindungsgemäß Expressionskassetten oder erfindungsgemäß Wirtszellen, die im folgenden als „transgene Pflanzenzellen“ bezeichnet werden.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die mit einem erfindungsgemäßem Vektor zur Transformation von pflanzlichen Zellen und besonders bevorzugt zur Integration von Fremd-DNA (z.B. Transgenen) in das pflanzliche Genom. Ein Beispiel für derartige Vektoren sind binäre Vektoren, die zum Teil kommerziell erhältlich sind.

25 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Pflanzen, die erfindungsgemäß Pflanzenzellen enthalten. Diese können grundsätzlich jeder beliebigen Pflanzenart, -gattung, -familie, -ordnung bzw. -klasse angehören, die gewerlich nutzbar sind. Es können sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen sein. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäß Pflanzen Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die für den Menschen von agrarwirtschaftlichem, forstwirtschaftlichem und/oder gartenbauwirtschaftlichem Interesse sind. Bevorzugt sind dabei landwirtschaftliche Nutzpflanzen, insbesondere B. der Gattung *Agrobacterium*.

Getreidearten wie z.B. Weizen, Hafer, Gerste, Roggen, Mais, Reis oder Futter- und Weidegräser (wie z.B. Alfalfa, weißer oder roter Klee).

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren

5 zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül, einem erfindungsgemäßen Vektor, einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder mit einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, vorzugsweise einem Mikroorganismus transformiert, die transformierten 10 Zellen, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und im Fall der Herstellung transgener Pflanzen daraus Pflanzen regeneriert.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung eines oder 15 mehrerer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, Vektoren, Expressionskassetten oder gegebenenfalls Wirtszellen zur Herstellung transgener Wirtszellen, insbesondere transgener Pflanzenzellen und Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur 20 karyopsenspezifischen Genexpression in Pflanzen, worin eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle direkt oder mittels eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen Vektoren, Expressionskassetten oder Wirtszellen stabil in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird und aus besagter Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird.

25

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur karyopsenspezifischen Gensuppression in Pflanzen, worin eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle direkt oder mittels eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen Vektoren, Expressionskassetten oder Wirtszellen stabil in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird und aus besagter Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird, vorzugsweise mittels Cosuppression.

Die erfindungsgemäßen Pflanzen können nach dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden, z.B. durch Transformation pflanzlicher Zellen oder Gewebe und Regeneration ganzer Pflanzen aus den transformierten Zellen bzw. dem Gewebe.

5 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von 10 Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können 15 einfache Plasmide wie z. B. pJUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist z.B. die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können 20 weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z. B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri- Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri- Plasmid T-DNA als Flankengebiet mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

25 Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muss die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien

replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediaire Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derart transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alkmaardam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

5 Monokotyle Pflanzen werden inzwischen routinemäßig mittels des biolistischen Ansatzes und mittels Agrobakterien transformiert (Komari et al., (1998); *Advances in cereal gene transfer; Current Opinion in Plant Biotechnology* 1, S. 161 ff.; Bilang et al. (1999), *Transformation of Cereals, Genetic Engineering*, 12, S. 113-148 Hrsg.: JK Settlow, Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York). Weitere geeignete Methoden sind die elektrisch oder chemisch induzierte DNA-Aufnahme in Protoplasten, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrosporen und Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimenden Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryon durch Quellung (zur Übersicht: Potrykus, Physiol. Plant (1990), 269-273).

10 Darüber hinaus stellen die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen oder die Einbringung von DNA mittels Glasfasern alternative, dem Fachmann bekannte Verfahren dar.

15 Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschreiben, z.B. für Gerste (Van und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296 (1982), 72-74) und für Weizen (Becker et al., Plant J. (1994) 5 (2): 229-307; Nehra et al., Plant J. 5 (1994), 285-297).

20 Für Reis wurden unterschiedliche Transformationsmethoden beschrieben, wie z.B. die Agrobakterium-vermittelte Transformation (Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Hiei et al., Plant Mol. Biol. 35 (1997), 205-218; Park et al., J. Plant Biol. 38 (1995), 365-371), die Protoplasten-Transformation (Datta, In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 66-75; Datta et al., Plant Mol. Biol. 20 (1992), 619-629; Sadasivam et al., Plant Cell Rep. 13 (1994), 394-396), der biolistische Ansatz zur Pflanzentransformation (Li et al., Plant Cell Rep. 12 (1993), 250-255; Cao et al., Plant Cell Rep. 11 (1992), 586-591; Reed, A. Pöhler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

25 30

"Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 201-208).

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch das Vermehrungsmaterial und

5 Erregett der erfindungsgemäß Pflanzen, das erfindungsgemäß Pflanzenzellen enthält. Der Begriff "Vermehrungsmaterial" umfaßt dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder generativem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome, Wurzelstücke oder Knollen. Anderes

10 Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen oder Samen.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäß 15 Promotoren oder der mittels des erfindungsgemäß Verfahrens identifizierten Promotoren zur karyopsenspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzenzellen oder Pflanzen.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäß 20 erfindungsgemäß Promotoren oder der mittels des erfindungsgemäß Verfahrens identifizierten Promotoren zur karyopsenspezifischen Co-suppression von Genen oder Transgenen in Pflanzenzellen oder Pflanzen.

Der Begriff "Transgen" bedeutet dabei eine künstlich in eine Pflanze eingeführte 25 DNA-Sequenz, die ein oder mehrere der erfindungsgemäß Nukleinsäuremoleküle enthalten.

Diese und andere Ausführungsformen sind dem Fachmann durch die Beschreibung und die Beispiele der vorliegenden Erfindung offenbart. Weiterführende Literatur zu den open angeführten Methoden, Mitteln und Anwendungen, die im Sinne der vorliegenden Erfindung benötigt werden, sind dem Fachmann aus dem Stand der

Technik bekannt. Zu diesem Zweck bieten sich unter anderem öffentliche Datenbanken an (z.B. "Medline"), die ggf. über Internet zur Verfügung stehen, z. B. unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Weitere Datenbanken und Adressen sind dem Fachmann geläufig und können aus dem Internet entnommen werden, z. B. unter der Adresse <http://www.lycos.com>. Eine Übersicht über Quellen und Informationen zu Patenten bzw. Patentanmeldungen in der Biotechnologie ist in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 gegeben.

5 Zur spezifischeren Beschreibung der Erfindung wird einer der erfindungsgemäß Promotoren durch SEQ ID No. 1 repräsentiert, bestehend aus 3.809 Basen der genomischen Sequenz des isolierten gbss1-Subklons p11/1 wie durch DSM 13398 hinterlegt. Darin enthalten sind 3.163 Basen des 5'-flankierenden Bereichs und 646 Basen des codierenden Bereichs der GBSS I. Vergleiche der in SEQ ID No. 1 aufgeführten genomischen Sequenz mit dem isolierten cDNA-Klon der GBSS I

10 (Block (1997) Dissertation, Universität Hamburg) zeigen im 5'-untranslatierten Bereich an Position 2.333 bis 2436 eine Homologie von etwa 75 % und an Position 3.216 bis 3.262 eine Homologie von 100% mit dem cDNA-Klon. Der 5'-untranslatierte Bereich des Gens wird durch ein ca. 670 Basen langes Leader-Intron (Position 2.436-3.101 in Seq ID No. 1) unterbrochen.

15 Der 5'-flankierend vom Startcodon gelegene DNA-Bereich (Promotor und 5'-untranslatierter Bereich mit Leader-Intron; SEQ ID. No. 1 Position 1-3.139) wurde hinsichtlich bekannter *cis*-regulatorischer DNA-Elemente von Pflanzen untersucht. Es wurden Endosperm- bzw. samenspezifische DNA-Elemente an folgenden Positionen im GBSS I-Promotor (= SEQ ID No. 1) identifiziert:

20 -300bp-Elemente (TGTAAG) Position 906 (-) TGAAARK

RY repeat (CATGCATG) Position 2138 (+) CATGCATG

25 Position 929 (+) CATGCAT Position 989 (+) CATGCAT

27	Position 270 (-) CATGCAT	SEF4 Motiv	Position 330 (+) RTTTTTR
	Position 2139 (-) CATGCAT		Position 2868 (+) RTTTTTR
	ACGT Motiv		Position 241 (+) RTTTTTR
5	Position 1346 (+) GTACGTG		Position 639 (+) RTTTTTR
	Position 1401 (+) GTACGTG		Position 2878 (+) RTTTTTR
	Position 1836 (+) GTACGTG		Position 721 (-) RTTTTTR
	Position 2488 (-) TATCCAT		Position 2657 (-) RTTTTTR
	Amylase-Box		Position 3038 (-) RTTTTTR
10	E-Boxen (CANNTG)	10 DNA-Elemente für eine pollenspezifische Genexpression wurden an folgenden Positionen gefunden:	
	Position 451 (+) CANNTG	Pollen1	Position 609 (+) AGAAA
	Position 942 (+) CANNTG	(LAT52; <i>L. esculentum</i> )	Position 702 (+) AGAAA
	Position 967 (+) CANNTG		Position 1053 (+) AGAAA
	Position 987 (+) CANNTG		Position 1057 (+) AGAAA
	Position 997 (+) CANNTG		Position 1449 (+) AGAAA
15	Position 1038 (+) CANNTG		Position 3046 (+) AGAAA
	Position 1140 (+) CANNTG		Position 27 (-) AGAAA
	Position 1363 (+) CACGTG (G-Box)		Position 104 (-) AGAAA
	Position 1571 (+) CANNTG		Position 141 (-) AGAAA
	Position 1988 (+) CANNTG		Position 254 (-) AGAAA
	Position 2014 (+) CANNTG		Position 409 (-) AGAAA
20	Position 2035 (+) CANNTG		Position 520 (-) AGAAA
	Position 2554 (+) CANNTG		Position 559 (-) AGAAA
	Position 3032 (+) CANNTG		Position 563 (-) AGAAA
	Position 1050 (-) CACGTG (G-Box)		Position 656 (-) AGAAA
25	Position 1695 (-) CACGTG (G-Box)		Position 771 (-) AGAAA
	Position 2949 (-) CACGTG (G-Box)		Position 822 (-) AGAAA
	Napin Motiv (TACACAT)		Position 2707 (-) AGAAA
			Position 2812 (-) AGAAA
			Position 2819 (-) AGAAA
30	Position 308 (+) TACACAT		
	Position 940 (+) TACACAT		
	Position 264 (-) TACACAT		
			30

29

Position 2923 (-) AGAAA

Q-Element (ZM13)  
Position 2842 (+) AGGTCA  
Position 2847 (+) AGGTCA

5

DNA-Elemente, die an einer durch Zucker regulierten Genexpression beteiligt sind wurden an folgenden Positionen gefunden:

TATCCAY-Motiv  
Position 2488 (-) TATCCAY

10 CGACG-Element (AMY3, *O. sativa*)

Position 1761 (+) CGACG  
Position 1289 (-) CGACG  
Position 1488 (-) CGACG  
Position 1748 (-) CGACG  
Position 932 (-) CGACG

15

Wurzelspezifische DNA-Elemente wurden an folgenden Positionen gefunden:  
Wurzel Motiv (Triticum aestivum POX1) Position 63 (+) ATATT

Position 278 (+) ATATT  
Position 501 (+) ATATT  
Position 753 (+) ATATT  
Position 890 (+) ATATT  
Position 277 (-) ATATT  
Position 304 (-) ATATT  
Position 870 (-) ATATT

25

DNA-Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch ABA beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:  
ABRE Motiv (*Oryza sativa* em)  
Position 1347 (+) TACGTGTC  
Position 1067 (-) TACGTGTC  
ABRE Motiv (Triticum aestivum L. Em) Position 1930 (+) ACGTSSSC

30

DBBF Core (CDC3)

Position 941 (+) ACACNNG  
Position 951 (+) ACACNNG  
Position 966 (+) ACACNNG  
Position 996 (+) ACACNNG  
Position 1010 (+) ACACNNG  
Position 1025 (+) ACACNNG  
Position 1107 (+) ACACNNG  
Position 1570 (+) ACACNNG  
Position 1603 (+) ACACNNG  
Position 2077 (+) ACACNNG  
Position 296 (-) ACACNNG

5

DNA-Elemente, die an einer durch Zucker regulierten Genexpression beteiligt sind wurden an folgenden Positionen gefunden:

TATCCAY-Motiv  
Position 2488 (-) TATCCAY

10

Position 1761 (+) CGACG  
Position 1289 (-) CGACG  
Position 1488 (-) CGACG  
Position 1748 (-) CGACG  
Position 932 (-) CGACG

15

DNA-Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch Auxin bzw. Ethylen beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:

Auxin response factor (ARF A.thaliana) Position 2984 (-) TGTCCTC  
NBBF1 Motiv (rolB)  
Position 614 (+) ACTTTA  
Position 793 (+) ACTTTA  
Ethylen RE (*L. esculentum*)  
Position 3022 (+) AWTTCAA  
Position 3028 (+) AWTTCAA

DNA-Elemente, die für eine Licht- oder Temperatur-regulierte Genexpression stehen, wurden an folgenden Positionen im GBSS I-Promotor gefunden:

I-Box  
Position 713 (-) GATAA  
Position 796 (-) GATAA  
Low Temperature RE (*H. vulgare*)  
Position 1019 (+) ACCGACA  
Position 1020 (+) CCGAC  
Position 1324 (+) CCGAC

20

25

Position 1749 (-) CCGAC  
Position 2523 (-) CCGAC

AT-reiche Regionen, wie sie aus verschiedenen anderen Promotoren als Enhancerelemente bekannt sind (J.E. Sandhu, 1998, Plant Mol. Biol. 37: 885-96) finden sich in dem durch SEQ ID No.1 repräsentierten Promotor an verschiedenen Stellen: Positionen 1-958, 1024-1213, 1912-1960 sowie 2527-3127. Ein basales DNA-Element, das für die Transkriptionsinitiation wesentlich ist (TATA-Box), wurde an Position 2378 gefunden. 25 bp downstream der TATA-Box befindet sich nach Nikolov (D.B. Nikolov, 1997, PNAS 94: 15-22) der Transkriptionsinitiationspunkt. Neben anderen bekannten DNA-Motiven (CAAT-Box, GT1-Box, MART-Boxen, DOF-Boxen, Myb- und Myc-Boxen) entfällt der unter SEQ ID No.1 aufgeführte Promotor weitere, bisher unbekannte Sequenzmotive. Ein DNA-Sequenzmotiv (CCACACACTACAAA) an Position 2.293 zeigt Homologien zu DNA-Sequenzabschnitten des gbs1-Promotors aus Gerste und einem DNA-Bereich im Puroindolin-Promotor aus Weizen (Digeon et al. (1999) Plant Mol. Biol. 39: 1101-1112; Acc. No. AJ000548), der in Reis die Expression des GUS-Reportergens in Endosperm, Aleuronzellen und im Perikarp reguliert. Repeats der Sequenz (CA)<sub>n</sub> befinden sich an den Positionen 948-956, 1.007-1.015 und 1.024-1.030. Ein sich wiederholendes Sequenzmotiv (CTCACCC) befindet sich an den Positionen 1.259 und 1.267. Zwei direkte Sequenzwiederholungen (ACGTACGT) befinden sich an den Positionen 1.344 und 1.349. Weitere Sequenzwiederholungen (GAGAGC) befinden sich an Position 1.553, Position 1.614 (CGCGTG) und 1.644 (CCACCGG). Ein Motiv der Sequenz (AACAC)<sub>4</sub> befindet sich an Position 1.887. Ein sich wiederholendes Motiv der Sequenz (GAA)<sub>n</sub> befindet sich an den Positionen 2.321 und 2.379 bis 2.423. Sequenzbereiche, die Homologien zum GBSS I-Promotorbereich aus Gerste (GenBank Acc. No. X07931) aufweisen, befinden sich an den Positionen 1.383-1.406 (95% Sequenzidentität), 2.136-2.179 (93% Sequenzidentität) und 2.229-2.284 (90% Sequenzidentität).

#### Hinterlegung von Mikroorganismen:

Das erfindungsgemäß Nukleinsäuremolekül gemäß SEQ ID No. 1 wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, Deutschland gemäß Budapester Vertrag am 17. März 2000 (17.03.2000) durch Hinterlegung von Plasmid DNA offenbart. Plasmid p1/1 enthält SEQ ID No. 1, Hinterlegungsnummer DSM 13398.

**Klonierungsverfahren**

Zur Klonierung in *E.coli*-Bakterienstämme wurden die Vektoren pBluescript™ II SK(+-) bzw. KS(+-) Phagemid Vektoren (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Lambda Fix® II / Xhol Klonierungsvektor (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

**Bakterienstämme**

10 Für die Bluescript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.

15 Für die Bluescript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.

20 Für grundlegende molekulärbiologische Arbeitstechniken wird auf Sambrook et al. 1989 verwiesen: Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition; Cold Spring Harbour Laboratory Press).

25 Ausführungsbeispiele

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie in irgendeiner Hinsicht zu beschränken.

1. Herstellung der genomischen Weizenbank
- 30 Zur Herstellung der genomischen Weizenbanken wurde Gesamt-DNA aus etiolierten Keimlingen von *Triticum aestivum* L. cv. "Florida" isoliert. Zur Anzucht steriler

etiolierter Keimlinge wurden reife Karyopsen für 20 min mit 1% NaOCl, 0,1% (v/v) Mucasol® (Merz & Co., Frankfurt, Deutschland) inkubiert und anschließend 3x mit Aqua bidest gewaschen. Die Karyopsen wurden auf sterilem MS-Medium (Murashige & Skoog (1962), Physiol. Plant. 15: 473-479), dem 0,3% (w/v) 5 GELRITE® (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) zur Verfestigung zugesezt wurde, ausgelegt. Das Wachstum erfolgte bei 26°C in Dunkelheit.

Vierzehn Tage nach dem Plättieren wurden die Keimlinge abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

10 Der partielle Verlust der genetischen DNA erfolgte mit den Restriktionsenzymen BamH I bzw. Sau3A I (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland). Hierzu wurden 3 Aliquots die jeweils 100 µg genetische DNA, 150 µl des entsprechenden Restriktionspuffers in einem Gesamtvolume von 1,5 ml mit 12,5 Units, 6,25 Units bzw. 3,125 Units des Restriktionsenzyms BamH I bzw. 1,56 Units, 0,78 Units bzw. 0,39 Units Sau3A I für 1 h bei 37°C restriktiert. Aliquots der partiell restriktierten DNA wurden anschließend gelektrophoretisch auf den Grad der Restriktion analysiert. Die Restriktionsenzyme wurden durch einmalige Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) Extraktion aus den Ansätzen entfernt. Abschließend wurde Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 10% (w/v) zu jedem Ansatz zugegeben.

20 Die Größenfraktionierung der partiell restriktierten DNA erfolgte in kontinuierlichen 10-40% Saccharose-Gradienten (w/v) (Sambrook *et al.* (1989)). Die einzelnen Aliquots der partiell restriktierten DNAs wurde vor dem Beladen jeweils eines 15 ml Saccharosegradienten für 10 min auf 68°C erwärmt und dann auf 20°C abgekühlt. Die Zentrifugation der Gradienten erfolgte für 24 h, bei 20°C und 22000 rpm (Beckmann, Rotor SW 40). Nach der Zentrifugation wurden die einzelnen Zentrifugentöpfchen im Boden angestochen und jeweils 500 µl Aliquots gesammelt. Von den einzelnen Fraktionen wurden 30 µl in einem 0,5%igen Agarosegel 25 aufgetrennt und die Größenverteilung der DNA in den einzelnen Fraktionen

bestimmte. Fraktionen, die genetische DNA von ca. 4,0 kb und größer enthielten, wurden vereinigt. Die Saccharose aus den Proben wurde durch Dialyse gegen Tris/EDTA-Puffer (10 mM/1 mM) entfernt. Anschließend wurden die Proben mit 2-Butanol eingeelegt und die DNA aus den Proben mit 2 Volumeneinheiten EtOH (99,8%)/ 5 2 M Ammoniumacetat (Endkonzentration) bei Raumtemperatur (RT) ausgefällt.

Zum Auffüllen der 3'Enden der partiell restriktierten DNA wurden 20 µg der BamH I bzw. Sau3A I restriktierte DNA mit 1 mM dATP, 1 mM dGTP (Roche, Mannheim), 6 µl 10x Pfu Reaktionspuffer und 10 Units native Pfu-DNA Polymerase (DNA-Polymerase mit „proof-reading“ Aktivität; Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) in einem Endvolumen von 60 µl inkubiert. Die Reaktion wurde bei 72°C für 1 h 30 min durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-, eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion der DNA und nachfolgend eine Präzipitation der DNA mit 1/10 Vol. 3M NaAc und 2,5 15 Vol. EtOH (absolut).

1.1. Ligation in Lambda Fix® II/Xho I Partial Fill-In Vektoren (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Die BamH I bzw. Sau3A I restriktierte genetische DNA wurde in den Lambda Fix® II Vektors, 0,4 µg BamH I bzw. Sau3A I restriktierte genetische DNA, 0,5 µl 10x Ligationspuffer, 2 Weiss Units T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland); Weiss *et al.* (1998) J. Biol. Chem., 243: 4543-4555) in einem 20 Endvolumen von 5 µl.

1.2. In vitro Verpackung der Ligationsprodukte

Zur Verpackung der Lambda Phagen wurde das *in vitro*-Verpackungskit "Gigapack® II Gold" der Firma Stratagene (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) 30 verwendet und den Angaben des Herstellers gefolgt.

Von den Ligationsansätzen wurden jeweils 1 µl zu den Verpackungsansätzen dazugegeben und im Folgenden den Angaben des Herstellers gefolgt.

1.3. Anzucht der Bakterien zur Phagervermehrung

5 Zur Phagervermehrung wurde der *E.coli*-Bakterienstamm XL1-Blue MRA (P2) verwendet. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2% (w/v) Maltose bis zu einer OD 600 = 0,5 bei 37°C, 180 rpm angezogen. Anschließend wurden die Bakterien bei 2000 rpm, 10 min, 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und die Bakteriendichte auf OD<sub>600</sub> = 0,5 eingestellt.

10 Zur Phagervermehrung wurden aus den Verpackungsansätzen 1 µl aus den Originalansätzen bzw. 1:10 Verdünnung der Originalansätze mit 200 µl Bakteriensuspension (OD<sub>600</sub> = 0,5) gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert.

15 Anschließend wurden die einzelnen Ansätze mit 3 ml TOP-Agarose (48°C) gemischt und auf NZY-Festmedium nach Herstellerangaben (s.o. Lambda Fix® II/xho I Partial Fill-In Vektoren, Stratagene) plattierte. Die Platten wurden für ca. 16 h bei 33°C inkubiert.

20 Die Phagentiter der Sau3A I bzw. der BamH I genomischen Banken wurden durch Auszählen der Phagenplaques bestimmt. Für die Sau3A I bzw. die BamH I Primärbanken wurden Phagentiter von  $2.2 \times 10^7$  pfu/ml bzw.  $1.4 \times 10^7$  pfu/ml ermittelt. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgrößen wurden von jeder Bank 10 einzelne Phagenklone amplifiziert, die Phagen-DNA isoliert (Sambrook *et al.* 1989) und die Insertgrößen nach Restriktionsverdau und gelektrophoretischer Auftrennung ermittelt. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt ca. 15,0 Kb für die BamH I bzw. 15,6 Kb für die Sau3A I Bank.

1.4. Amplifizierung der genomischen Banken

Zur Herstellung repräsentativer, amplifizierter genomischer Banken wurden von jeder Bank ca. 4,5 Millionen pfu plattiert. Die Amplifizierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Stratagene). Die Phagentiter der amplifizierten Banken betrug  $6,3 \times 10^9$  pfu/ml (BamH I-Bank) bzw.  $2,0 \times 10^9$  pfu/ml (Sau3A I-Bank).

2. Durchmustern der genomischen Banken

Die Identifizierung und Isolierung von Phagenklonen, deren genomische Inserts Sequenzen der gbssi-Gene tragen, erfolgte über Plaque-Hybridisierung. Zum Durchmustern der genomischen Banken wurden ca. 500.000 Phagen von jeder Bank ausplattierte. Das Ausplattieren der Phagen und Abziehen der Platten erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989; Stratagene Lambda Fix® II Manual). Als genspezifische Sonden wurden DNA-Fragmente von cDNA-Klonen der GBSS I (Blockt, M. (1997) "Isolierung, Charakterisierung und Expressionsanalysen von Stärkesynthase-Genen aus Weizen (*Triticum aestivum* L.)". Dissertation, Universität Hamburg) eingesetzt.

Die Markierung eines 283bp großen DNA-Fragments des gbssi cDNA-Klons erfolgte über eine spezifische PCR-Reaktion, unter Einbau von DIG-markierten dUTP's (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die PCR-Reaktion wurde mit Primern durchgeführt, die innerhalb des ersten Exons des gbssi cDNA-Klons (Position 146-429) liegen.

20 W1: 5'-ATGGCGGCTCTGGTCACGTC-3' (SEQ ID No. 9)

25 W2: 5'-AGGCCGCCAGTCCTGCTCA-3' (SEQ ID No. 10)

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 µl PCR-Puffer (10xconc.; Life Technologies)

3 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM; Life Technologies)

30 3 µl DIG dUTPs (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

3 µl dNTP-Mix (je 5 mM)

6 $\mu$ l Primer W1 (10pmol)  
 6 $\mu$ l Primer W2 (10pmol)  
 10ng Template (cDNA-Klon der gbssI)  
 1 $\mu$ l Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l; Life Technologies)  
 5 ad 100 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:

- I. 94°C, 5min
- II. 94°C, 30sec
- III. 62°C, 30sec
- IV. 72°C, 60sec (IV. $\rightarrow$  II. 29 Schleifen)
- V. 72°C, 5min

Die Prähybridisierung der Filter erfolgte in 5x SSC, 3% Blockingreagenz (Boehringer Mannheim), 0,2% Na-dodecylsulfat (SDS), 0,1% N-Laurylsarcosin und 30 $\mu$ g/ml Heringssperma-DNA bei 65°C im Wasserbad. Die Hybridisierung mit den DIG-markierten DNA-Sonden (6ng/ml Hybridisierungslösung) erfolgte über Nacht bei 65°C im beschriebenen Standard-Hybridisierungspuffer. Alle weiteren Schritte der Chemilumineszenz-Reaktion mit CSPD® erfolgten nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Positive Plaques wurden ausgestochen und über zwei weiteren Runden der Amplifikation und Plaque-Filterhybridisierung vereinigt. Die DNA der isolierten positiven Phagen wurden gereinigt Qiagen® Lambda Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und nach einer Agarose-Gelelektrophorese in Southern-Hybridisierungen mit den bereits beschriebenen Sonden analysiert.

3. Subktonierung der  $\lambda$ -Phagenklone in bakterielle Vektoren (pBluescript™ II)
- 30 Die genomischen Inserts der positiven Phagenklone wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die resultierenden Subfragmente wurden in

bakterielle Vektoren (pBluescript™ II SK(+/-) bzw. KS(+/-) Phagemid Vektoren; Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) kloniert.

Über Southern-Hybridisierungen erfolgte die Isolierung von gbssI-spezifischen Klonen mit 5'-stromaufwärts gelegenen regulativen Elementen.

4. Sequenzanalysen
- Für die Sequenzierung der genomischen Klonen der gbss I und ihrer 5'-stromaufwärts gelegenen regulativen Elemente wurde die Firma SeqLab GmbH 10 (Göttingen) beauftragt.

5. Klonierungen von Promotor-Testvektoren
- Die Funktionsfähigkeit der in SEQ ID No. 1 aufgeführten 5' flankierenden DNA-Bereiche wurde in transienten und stabilen Expressionsanalysen überprüft. Als Reportergen wurde das Gen der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) verwendet (Jefferson 1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol.5 (4): 387-405. Es wurden Promotorvektoren kloniert, in denen die codierende Region des gus-Gens (uidA) unter der Kontrolle des in SEQ ID No. 1 (Position 1-3-139) aufgeführten 5' flankierenden DNA-Bereichs steht. Die Klonierung erfolgte als transkriptionale Fusion. Zunächst wurde das uidA-Gen über einen partiellen Verdau zusammen mit dem nos-Terminator aus dem Vektor pCal-GUS (uidA-Gen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors; Chris Warren, Stanford Universität, unveröffentlicht) herausgeschnitten und hinter die Multiple Cloning Site von pBluescript (Stratagene) kloniert. Der so erzeugte promotohose Vektor (uidA-nos) wurde für die weiteren 25 Klonierungen verwendet.

Auch die 5'-untranslatierte Leadersequenz einer mRNA kann einen Einfluß auf die gewebespezifische Expression eines Gens haben (Rouster *et al.* (1998) Plant J. 33: 435-440). Die klonierten Promotorvektoren beinhalteten daher diesen Bereich des GBSS I-Gens. In der gewählten Klonierungsstrategie liegt das Start-Codon der  $\beta$ -Glucuronidase an der Position des Start-Codons der GBSS I.

5.1. Klonierung der gbss I-Promotortestvektoren

Das Ausgangskonstrukt des gbss I-Promotortestvektors trägt etwa 7,5 kb des 5' flankierenden DNA-Bereiches der gbss I. Die Klonierung in den promotorlosen uidA-nos-Vektor erfolgte über Restriktionsverdau der Plasmide p11/1 (gbss1) und puidA-nos mit den Enzymkombinationen Nco I / Xba I, NcoI / Sac I und für einen partiellen Verdau mit Nco I / Sal I. Der 7,5 kb lange 5' flankierende Bereich wurde anschließend durch unterschiedliche Restriktionen verkürzt, was zur Entfernung von DNA-Bereichen führte, in denen einige der beschriebenen DNA-Elemente liegen. Der gbss I-Promotortestvektor wurde im 5' flankierenden Bereich durch Restriktionen mit den nachfolgend genannten Restriktionsenzymen deletiert. Es wurden auf diese Weise folgende Deletionskonstrukte des gbss I-Promotors kloniert:

- 4,0 gbss II / gus (Sac I-Restriktion ca. 4 kb upstream des Startcodons von gbss1; enthält die Nukleotide 1-3139 von SEQ ID No. 1);
- 15 -1,9 gbss I / gus (XbaI-Restriktion an Position 1240; enthaltend die Nukleotide 1241-3139 von SEQ ID No. 1);
- 1,6 gbss I / gus (SmaI-Restriktion an Position 1514; enthaltend die Nukleotide 1515-3139 von SEQ ID No. 1);
- 1,3 gbss I / gus (KpnI-Restriktion an Position 1826; enthaltend die Nukleotide 1827-3139 von SEQ ID No. 1);
- 20 -1,0 gbss I / gus (BamHI-Restriktion an Position 2176; enthaltend die Nukleotide 2177-3139 von SEQ ID No. 1) und
- 0,4 gbss I / gus (Bgl II-Restriktion an Position 2727; enthaltend die Nukleotide 2692-3139 von SEQ ID No. 1).

25

6. Transiente Expressionsanalysen der Promotor-Testvektoren

Die Funktionsfähigkeit der isolierten Promotorkonstrukte wurde in transienten Expressionsanalysen überprüft. Die Tests wurden mit den aus Beispiel 5 erhaltenen gbss I-Promotortestvektoren und ihren Deletionskonstrukten durchgeführt.

30

- Die transienten Expressionsanalysen erfolgten nach biolistischer Transformation von verschiedenen Geweben (Karyopsen, Embryonen, Blätter, Wurzeln) von Weizen. Die Transformation von Embryonen, Blätter und Wurzeln wurde nach Becker *et al.* (Plant J. (1994) 5 (2): 229-307) durchgeführt, während die biolistische Transformation des Endosperms von Karyopsen modifiziert nach Mena *et al.* (Plant J. (1998) 16(1), 53-62) erfolgte. Der Nachweis der Reporteraktivität erfolgt durch histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität (Jefferson (1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol.5 (4): 387-405). Die Experimente an 10-30 Tage alten (dap), längs- und quer geschnittenen Weizenkaryopsen zeigten, daß der Promotor zur Expression des Reportergens im Endosperm führt. In den transienten Tests war die Aktivität des uidA-Reportergens unter Kontrolle des gbss1-Promotors relativ stark ausgeprägt.
- 6.1. Folgende Deletionskonstrukte des GBSS I-Promotors erwiesen sich in transienten Expressionsanalysen als funktionsfähig:
  - 15 -7,5 gbss II / gus (enthält ca. 7,5 kb 'upstream' des Startcodons von gbss I; einschließlich der Nukleotide 1-3139 SEQ ID No.1)
  - 4,0 gbss I / gus, enthaltend die Nukleotide 1-3139 von SEQ ID No.1)
  - 1,9 gbss I / gus (XbaI-Restriktion an Position 1240)
  - 20 -1,6 gbss I / gus (SmaI-Restriktion an Position 1514)
  - 1,3 gbss I / gus (KpnI-Restriktion an Position 1826)
  - 1,0 gbss I / gus (BamHI-Restriktion an Position 2176)
- 25 Nach einer Deletion an Position 2,691 von SEQ ID No. 1 (-0,4 gbss I / gus) konnte keine GUS-Aktivität des Reportergens mehr festgestellt werden.
- 7. Stabile Transformation von Weizen mit den Promotor-Testvektoren Die in Beispiel 5 beschriebenen Promotor-Testvektoren und Deletionskonstrukte wurden zur Erzeugung stabil transformierter Weizenpflanzen verwendet:
  - 30 -4,0 gbss I / gus (s.o.)
  - 1,9 gbss I / gus (XbaI-Restriktion an Position 1240; SEQ ID No.1)

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgte nach der Methode von Becker et al. (Plant J. (1994) 5 (2): 229-307). Als Selektionsmarker wurden die glutosinat-5 bzw. Neomycin-Resistenz tragenden Plasmide p35S-PAT (Aventis CropScience GmbH, Frankfurt) bzw. pAct1Dneo (Müller (1992) Dissertation, Universität Hamburg) eingesetzt.

8. Analyse der gus-Reportergenexpression in stabil transformierten 10 Weizenpflanzen

Die funktionelle Analyse der gbss 1- Promotoren erfolgte nach der Regeneration der transgenen Pflanzen und dem Nachweis einer stabilen und vollständigen Integration der Testkonstrukte in das WeizenGenom über Southern-Analysen.

15 Die Reportergenaktivität in den regenerierten transgenen Pflanzen wurde über einen histochemischen GUS-Nachweis untersucht. Verschiedene Gewebe der Transgenen (Blätter, Wurzel, Stiel, Endosperm, Embryo, Pollen) wurden analysiert. Die Karyopsen der mit den gbss 1-Testvektoren stabil transformierten Pflanzen weisen eine starke GUS-Färbung im zentralen Stärkeendosperm auf. Die GUS-Aktivität konnte bereits in sehr jungen Karyopsen im sich entwickelnden Endosperm nachgewiesen werden. Sehr früh nach der Bestäubung ist außerdem eine Aktivität des gus-Reportergens im Perikarp nachweisbar, die in älteren Karyopsen nicht mehr auftritt. Keine GUS-Aktivität konnte dagegen im Embryo, dem Aleuron und der Embryo-umgebenden Region nachgewiesen werden. Auch im assimilierenden Gewebe der Blätter, sowie in den Stielen und Wurzeln konnte keine Reportergen-Aktivität nachgewiesen werden. In transgenem Pollen wurde ebenfalls GUS-Aktivität detektiert. Quantitative Analysen der Expression des Reportergens erfolgten über fluorimetrische GUS-Nachweise sowie in Northern-Blot Analysen.

Tabelle 1: Expressionsmuster der gbss 1-Promotorkonstrukte (vgl. Bsp. 5-7)

Gewebe	-4.0 GUS	-1.9 GUS	-1.0 GUS
Endosperm			
jung	++	++	+
alt	+++	+++	-
Perikarp			
jung	+	+	+
alt	-	-	-
Chlorophyllschicht	-	-	-
Embryo	-	-	-
Scutellum	-	+	+
Pollen	+++	+++	+
Blatt	-	-	-

Hierbei zeigte sich, dass mit abnehmender Länge des in den Promotortestvektor integrierten Promotorfragments die Stärke der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität beziehungsweise der Reportergenexpression abnimmt. Eine Erklärung für diesen Effekt ist die Präsenz von AT-reichen Regionen, die bei der Verkürzung des Promotorbereiches schriftweise wegfallen. Diese Bereiche finden sich an den Positionen 1-958, 1024-1213 sowie 1912-1960 im Bereich des Konstrukt -4,0 gus, wobei die ersten zwei bei der Verkürzung zum Konstrukt -1,9 gus deletiert werden. Bei der weiteren Verkürzung zum Konstrukt -1,0 gus wird auch der AT-reiche Bereich 1912-1960 deletiert. Überraschend ist, dass auch das -1,0 gus-Konstrukt eine gewebspezifische Aktivität vermittelt, da in dieser Deletion von dem Bereich, der die TATA-Box 5' flankiert und in dem sich üblicherweise die cis-regulatorischen DNA-Elemente befinden, nur noch 38 bp vorhanden sind.

5 Northern Blot-Analysen zeigten die Expressionsmuster der unterschiedlichen Promotor-GUS-Konstrukte. Das uidA-Expressionsmuster im Verlauf der Karyopsenentwicklung der Pflanzen, die das Konstrukt -4,0 gus enthalten, entsprach sowohl im Endosperm als auch im Perikarp dem des gbss1-Gens. Auch das -1,9

GUS-Konstrukt und das -1,0 GUS-Konstrukt führten im Perikarp zu einem uidA-Expressionsmuster, das dem des gbss1-Gens entsprach. Für die Expression des uidA-Reportergens unter der Kontrolle dieser beiden Promotordelletionen im Endosperm war das Maximum der Aktivität weit nach hinten in der Karyopsenentwicklung verschoben, es lag etwa 25 Tage nach der Bestäubung oder später.

5 Karyopsenentwicklung verschoben, es lag etwa 25 Tage nach der Bestäubung oder später.

Patentansprüche:

1. Nukleinsäuremolekül mit der Funktion eines karyopsenspezifischen Promotors, das
  - 5 a) die durch Seq ID No. 1 definierte oder die durch DSM 13398 (Plasmid p 11/1) hinterlegte Nukleinsäuresequenz umfasst;
  - b) ein oder mehrere Sequenzelemente umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
    - i) cacgcaaaagg cggcgccg aggccaaagg (Seq ID No. 2);
    - 10 ii) agaaacaaac aaacaaacaa aaaagt (Seq ID No. 3);
    - iii) ccgttcaggaa cgtatgcgtg gtggccaaag aacacctacc ttgtgtctta tgacatgtga gccaaacag atggct (Seq ID No. 4);
    - iv) cccgttcagg cgttcgggtt ccggcc (Seq ID No. 5);
    - v) caggaggcttcg (Seq ID No. 6);
    - 15 vi) ttagccaggat ccacccctgt caacg (Seq ID No. 7) und vii) tactctggtc atgttaa (Seq ID No. 8);
    - c) einen funktionalen Teil der in a) genannten Nukleinsäuresequenz umfasst;
    - d) eine Sequenz umfasst, die mit mindestens einer der in a) und/oder b) genannten Nukleinsäuresequenzen hybridisiert; und/oder
  - 20 e) eine Sequenz umfasst, die mit einer der in a) genannten Nukleinsäuresequenzen zu etwa 60-89 %, vorzugsweise zu etwa 75-99 %, insbesondere zu etwa 90-99 % und ganz besonders bevorzugt zu etwa 95-99 % identisch ist.
- 25 2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, der ein in Pflanzen aktiver Promotor ist.
3. Expressionskassette enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2.

4. Vektor enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2 oder eine Expressionskassette nach Anspruch 3.

5. Vektor nach Anspruch 4, der zur Transformation von pflanzlichen Zellen geeignet ist.

6. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 - 5.

7. Wirtszelle nach Anspruch 6, die eine pro- oder eukaryontische Zelle ist.

8. Wirtszelle nach Anspruch 6, die eine Pflanzenzelle ist.

15 9. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 8.

10. Vermehrungsmaterial oder Erzeugt von Pflanzen nach Anspruch 9, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 8.

20 11. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen nach Anspruch 8, worin man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2, einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 - 5, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder mit einer Wirtszelle nach Anspruch 6 transformiert, und die transformierten Pflanzenzellen, -gewebe, -teile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert.

12. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen nach Anspruch 9, worin man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-2, einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4-5, mit einer Expressionskassette nach

Anspruch 3 oder mit einer Wirtszelle nach Anspruch 6 transformiert, die transformierten Pflanzenzellen, -gewebe, -teile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und daraus ganze Pflanzen regeneriert.

5 13. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-2 zur karyopsenspezifischen Expression von Genen in genetisch modifizierten Pflanzen.

14. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-2 zur karyopsenspezifischen Suppression von Genen in genetisch modifizierten Pflanzen.

15. Verfahren zur karyopsenspezifischen Genexpression in Pflanzen, worin ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-2 stabil in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird und aus besagter Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird.

16. Verfahren zur karyopsenspezifischen Gensuppression in Pflanzen, worin ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-2 stabil in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird und aus besagter Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird.

15 20 Genom einer Pflanzenzelle integriert wird und aus besagter Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird.

16. Verfahren zur karyopsenspezifischen Gensuppression in Pflanzen, worin ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-2 stabil in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird und aus besagter Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird.

30 30 Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-2, einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4-5, mit einer Expressionskassette nach

Promotor zur Generation in K - 26

הנפקה והפצה

110 > Aventis Concessions GmbH

卷之三

卷之三

272

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotoren, die eine Karyopsenspezifische Expression oder Suppression von Genen in genetisch modifizierten Pflanzen

In Pflanzen, Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Wirtszellen, die solche Promotoren enthalten, mit besagten Promotoren transformierte transgene Pflanzenzellen und Bifazien, sowie Vorfahren und Nachkommen.

Pflanzenzellen und Pflanzan-

## Pflanzenzellen und Pflanzen, sowie Verfahren zur Herstellung solcher

